STANDAR NASIONAL INDONESIA

SNI 01 - 2331 - 1991

UDC 637.5'8,07 : 579'2

METODE PENGUJIAN MIKROBIOLOGI PRODUK PERIKANAN

PENENTUAN ENTEROCOCCI

DEWAN STANDARDISASI NASIONAL - DSN

Berdasarkan usulan dari Departemen Pertanian
standar ini disetujui oleh Dewan Standardisasi Nasional
menjadi Standar Nasional Indonesia dengan nomor :

SNI 01—2331—1991

DAFTAR ISI

PENENTUAN ENTEROCOCCI

0. PENDAHULUAN

Banyak artikel telah membahas pentingnya enterococci dan Lancefield Group D streptococci sebagai indikator dari kontaminasi feces seluruh grup tersebut dimasukkan ke dalam fecal streptococci dan biasanya termasuk juga enterococci *(Streptococcus faecalis, dan Strep. faecium)*, dan *Strep. bovis* yang sangat tidak tahan panas, *Strep. Equinus* dan *Strep. atium*.

Streptococci tersebut biasa dijumpai pada faces, tetapi juga tersebar luas pada lingkungan kita di mana kehadirannya sangat tidak diperbolehkan. Kegunaannya sebagai indikator sanitasi harus dibatasi pada situasi di mana sudah diketahui sebagai daerah yang telah dikontaminasi oleh faces, misalnya sumber air dan bahan makanan mentah yang tidak diproses.

Selain dari batasan tersebut, terdapatnya enterococci dalam jumlah banyak pada beberapa bahan makanan tertentu menunjukkan kondisi penanganan yang tidak saniter atau tidak baik. Maka dari itu, enterococci, karena sifatnya yang sangat tahan terhadap pengeringan, suhu tinggi maupun rendah, detergen dan desinfektans, dapat digunakan sebagai indikator yang baik terhadap penanganan yang kurang baik pada peralatan yang digunakan untuk memproses makanan beku. Daya tahannya terhadap panas memungkinkannya untuk tetap hidup dalam penanganan dalam suhu tinggi yang juga dapat memungkinkan hidupnya virus-virus dalam makanan yang telah dipasteurisasi atau telah dikeringkan.

Ketahanannya terhadap panas yang tinggi itu juga dapat menyebabkan organisma ini tidak dapat diandalkan sebagai indikator umum terhadap kontaminasi feces. Ketahanannya terhadap proses pengolahan mempunyai sedikit korelasi dengan ketahanan dari *Salmonella* dan *Shigella* yang merupakan bakteri patogen dari faces yang bersifat kurang tahan terhadap proses pengolahan.

Tidak ada rekomendasi tentang batas toleran dari enterococci dalam makanan. Penilaian berdasarkan pengalaman dan pengamatan sangat diperlukan untuk menilai batas bahaya enterococci dalam suatu makanan.

1. FECAL STREPTOCOCCI

1.1 Plate Count Method (cocok untuk menganalisa makanan yang kemungkinan mengandung fecal streptococci dalam jumlah banyak).

1.1.1 Peralatan dan media.
1.1.1.1 Petridish
1.1.1.2 Pipet
1.1.1.3 Botol pengencer.
1.1.1.4 Colour counter.
1.1.1.5 Plate count Agar (PCA).
1.1.1.6 KF streptococcal agar atau Axide Dextrose Broth.

1.1.2 Prosedur.

1.1.2.1 Secara aseptis pipet 1 ml larutan yang telah dihomogenasi ke dalam petridish (duplo).

1.1.2.2 Tuangkan KF streptococci agar masing-masing sebanyak 12 ml kedalamannya.

1.1.2.3 Campur hingga merata dan biarkan hingga membeku. Tuangkan agar kontrol untuk masing-masing seri contoh.

1.1.2.4 Balik petridish dan inkubasi selama 48 jam pada suhu 35°C.

1.1.2.5 Setelah inkubasi, amati koloni-koloni dalam petridish dengan Quebec colony counter atau mikroskop untuk mengamati jenis pertumbuhan, ukuran koloni dan warna.

1.1.2.6 Pilih petridish yang menunjukkan adanya pertumbuhan sebanyak 30–300 koloni, dan hitung koloni yang berwarna merah tua atau yang memiliki pusat berwarna merah atau merah muda.

1.1.2.7 Hitung jumlah koloni per gram makanan dengan mengalihkan rata-rata jumlah koloni dengan faktor pengenceran.

1.2 Most Probable Number method (disarankan untuk digunakan sebagai metode penilaian kuliatas sanitas secara rutin di mana diperkirakan hanya terdapat fecal streptococci dalam jumlah yang sedikit).

Peralatan dan media.

1). Secara aseptis pipet 1 ml dari setiap larutan pengenceran dan masukkan ke setiap 5 tabung reaksi berisi KF streptococci atau azide dextrose broth. Apabila 10 ml larutan contoh yang diambil, gunakan media dengan konsentrasi 2 x lipat.
2). Inkubasi pada suhu 35°C selama 48 jam.
3). Setelah masa inkubasi 24 dan 48 jam, amati perubahan warna (dan adanya endapan) yang terbentuk. Tabung-tabung streptococci broth dengan warna kuning dinyatakan sebagai tabung positif untuk fecal streptococci, (tabung azide dextrose yang terdapat endapan dinyatakan positif).
4). Pilih tabung dengan pengenceran tertinggi di mana ke 5 tabungnya berwarna kuning atau ada endapan, dan 2 set pengenceran tinggi lainnya.
5). Tentukan MNP fecal streptococci per gram dari tabel MPN (lampiran III) yang berdasarkan nilai positif dari ke 3 pengenceran tersebut.

LAMPIRAN I.

MEDIA PEMBIAKAN

Beberapa dari formulasi media tercantum dalam lampiran ini tersedia secara komersial baik dalam bentuk dehidrasi atau yang langsung dapat digunakan. Kecuali adanya ketentuan-ketentuan yang diperlukan, formulasi komersil tersebut telah dibuktikan baik untuk digunakan pada metoda pengujian yang tercantum di atas. Akan tetapi instruksi untuk penyiapan media harus benar-benar ditaati.

Beberapa formulasi komersial berbeda dengan formulasi aslinya, sebab (1) adanya beberapa modifikasi yang telah dikembangkan atau (2) pembuat media telah menemukan bahwa beberapa perbedaan konsentrasi dan jenis bahan, kontrol pH yang lebih baik, produktifitas, hambatan dan sebagainya dapat dipertahankan. Perubahan-perubahan ini biasanya mendorong kegunaan dari media untuk tujuan-tujuan tertentu. Perubahan-perubahan formula telah dibuktikan tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroorganisma jika dibandingkan dengan formula aslinya. Selain itu, pengawasan terhadap kualitas dari media komersial memerlukan pengujian-pengujian untuk produktifitas, hambatan dan sebagainya untuk setiap lot media dengan pengujian kontrol mikroorganisma terpilih secara hati-hati. Oleh sebab itu kualitas dari media dehidrasi pada umumnya mempunyai tingkat yang lebih baik dibandingkan dengan media yang dibuat di laboratorium.
Merupakan suatu hal yang harus dilakukan untuk menginokulasi 1 set mikroorganisma kontrol pada setiap lot media. Pelaksanaan ini sangat disarankan terutama pada laboratorium yang berhubungan dengan riset dan pengembangan metoda analisa yang tergantung pada karakteristik biokimia spesifik dari mikroorganisma.

1. AZIDE DEXTROSE BROTH.

Polypeptone (Peptone)	15,0 g
Beef extract	4,5 g
Dextrose	7,5 g
Sodium chloride	7,5 g
Sodium azide	0,2 g
Aquadest	1000 ml

pH akhir 7,2 ± 0,2. Larutkan bahan dalam 1 liter aquadest. Panaskan dengan pengadukan yang sering, jika perlu, untuk mendapatkan larutan. Pindahkan 10 ml ke dalam tabung reaksi. Sterilisasi dengan autoclave selama 15 menit pada suhu 118°C.

2. KF STREPTOCOCCAL AGAR

Polypeptone (Peptone)	10,0 g
Yeast extract	10,0 g
Sodium chloride	5,0 g
Sodium glycerophosphate	10,0 g
Maltose	20,0 g
Lactose	1,0 g
Sodium azide	0,4 g
Agar	20,0 g
Aquadest	1000 ml

ph akhir 7,2 ± 0,2. Larutkan bahan dalam 1 liter aquadest. Panaskan dengan pengadukan yang sering dan teratur. Didihkan selama 5 menit setelah benar-benar terlarut. Dinginkan hingga 50—60°C dan tambahkan 1 ml larutan TTC 1% (2, 3, 5—triphenyl tetrazolium chloride) ke dalam 100 ml medium. Atau tanpa penambahan TTC, sterilisasi dengan autoclave pada suhu 121°C selama 10 menit. Indikator TTC dapat ditambahkan apabila KF agar telah dilelehkan sebelum dituang ke dalam petridish.

3. STANDARD METHODS AGAR (Plate Count Agar)

Tryptone	5 g
Yeast extract	2,5 g
Glucose	1 g
Agar	15 g
Aquadest	1 liter

Larutkan bahan dalam air sampai mendidih. Pindahkan ke dalam tabung-tabung atau labu-labu, dan autoclave 121°C, 15 menit. pH akhir 7,0 ± 0,1.

LAMPIRAN II.

REAGENSIA DAN DILUEN

LARUTAN PHOSPHATE BUFFERED WATER.

(Bufferfield's Buffer)

Stok larutan

Potassium acid phosphate (KH_2PO_4)	34 g
Aquadest	500 ml

Sesuaikan pH sampai 7,2 dengan sodium chloride 1 N, dan buat hingga 1 liter dengan aquadest.
Sterilisasi pada suhu 121^{o}C selama 20 menit, dan simpan dalam refrigerator.

Pengenceran Blanko.

Ambil 1,25 ml larutan stok di atas, dan buat 1 liter dengan aquadest. Pindahkan ke botol-botol dengan volume 99 ± 1 ml sterilisasi 121^{o}C, 20 menit.

LAMPIRAN III.

MPN — MOST PROBABLE NUMBER

1. PENDAHULUAN

Teknik Most Probable Number (MPN) menggunakan pendekatan "pengenceran berganda hingga punah" yang telah dibuktikan sangat baik untuk memperkirakan populasi mikoorganisma, terutama pada situasi di mana mikoorganisma ada dalam jumlah yang sangat sedikit, di mana makanan tertentu dapat menyulitkan metoda penghitungan lainnya, atau di mana media tertentu atau sistim pembiakan tertentu dibutuhkan. Untuk sebagian besar produk-produk makanan dan bahan-bahan makanan, struktur contoh, atau karakteristik lainnya, dapat menyulitkan penggunaan prosedur penghitungan koloni, apabila densitas mikroorganisme per gram makanan berjumlah kurang dari 10. Dalam keadaan ini, metoda MPN sangat berguna untuk memperkirakan jumlah mikroba, terutama untuk populasi yang sangat sedikit. Contoh penggunaan dari metode ini adalah untuk memperkirakan coliform di air, produk-produk ternak dan jenis-jenis makanan lain.

Pada makanan yang terkontaminasi, baik secara alamiah atau insidensial, distribusi mikroorganisma pada produk makanan dapat terjadi pada permukaan makanan, dapat tersebar secara homogen pada seluruh makanan atau terdapat pada bagian tertentu dalam makanan. Nilai-nilai yang terdapat pada tabel MPN dihitung berdasarkan dari asumsi bahwa mikroorganisma yang dicari berada dalam contoh makanan secara homogen. Pada contoh makanan dan larutannya, lemak dan partikel yang tidak dapat larut akan menghalangi tingkat homogenitas yang diasumsikan. Karena alasan ini, maka nilai MPN yang diperoleh dari contoh makanan akan kurang akurat dari pada nilai MPN yang diperoleh dari air di mana homogenitas contoh lebih mudah didapat.

Pada umumnya, hasil yang diperoleh dari prosedur MPN kurang akurat dibandingkan dengan prosedur penanaman. Misalnya, pada penghitungan *Enterobacter aerogenes*, prosedur penanaman non-selektif lebih baik dari pada MPN. Apabila organisma yang sama akan dihitung pada contoh-contoh seperti air sungai, di mana spesies bakteri dominan lain juga ada, prosedur MPN dapat dipilih. Kadang keakurasian harus diabaikan, sebab kurangnya prosedur penanaman yang baik, atau adanya kebutuhan untuk menguji larutan contoh dalam volume yang besar yang dipenuhi dengan material-material tertentu dan tercampur dengan spesies-spesies bakteri lainnya.

Tergantung dari pengambilan contoh dan informasi yang dicari, contoh harus dicampur (diaduk) atau dimaserasi untuk mendapatkan distribusi mikroorganisma yang homogen. Pada saat contoh yang homogen dibagi menjadi subcontoh melalui suatu seri pengenceran, beberapa dari sub-contoh akan mengandung sejumlah kecil contoh yang mana ini tidak mengandung mikroorganisma yang dicari. Ada dan tidak adanya sel-sel mikroba dalam sub-contoh dapat digunakan untuk secara statistik memperkirakan populasi mikroba dalam contoh aslinya. Metode MPN didasarkan pada pembagian contoh aslinya. Metoda MPN didasarkan pada pembagian contoh dan oleh karena itu dapat digambarkan sebagai "metoda pengenceran berganda punah". Akurasi dari satu kali pengujian tergantung dari jumlah tabung yang digunakan untuk tiap pengenceran. Informasi yang sangat memuaskan akan diperoleh apabila semua tabung dengan porsi

besar menunjukkan pertumbuhan, dan tabung-tabung dengan porsi kecil menunjukkan tidak adanya pertumbuhan.

2. PENANGANAN CONTOH

Pengumpulan contoh, pengirimannya dan pemeriksaan contoh harus dilakukan dengan cara yang aseptis dan dapat mewakili lot makanan yang diperiksa. Penggunaan alat-alat pengujian, media dan reagensia serta pelaksanaan pengujian harus sesuai dengan jenis bakteri yang ditentukan.
Dalam pengujian contoh, disarankan untuk menggunakan satu set tabung dari setiap kelompok medium yang diuji sebagai kontrol yang tidak di inokulasi. Seandainya, sebagai contoh, metode MPN 5 tabung yang digunakan, maka 1 set berisi 5 tabung harus diinkubasi sebagai kontrol yang tidak diinkubasi untuk meyakinkan bahwa medium yang digunakan benar-benar steril. Selain itu temperatur inkubator juga harus di kontrol.

3. KETERBATASAN METODE MPN

Metode ini umumnya digunakan apabila densitas mikroba dalam makanan adalah rendah; oleh sebab itu, lebih umum digunakan contoh dalam ukuran yang besar. Apabila contoh mengandung substansi penghambat, atau contoh itu sendiri adalah penghambat (yaitu NaCl), pertumbuhan dalam tabung-tabung dengan konsentrasi contoh yang tinggi akan terhambat.

Metode MPN untuk penghitungan umumnya digunakan untuk menentukan jumlah mikroorganisma dari jenis-jenis tertentu. Pada saat ini digunakan media-media selektif untuk beberapa jenis mikoorganisma. Jenis bakteri yang dapat dihitung meliputi salmonella, staphylococcus, faecal coliform, E. coli dan lain-lainnya.

4. PROSEDUR

Peraturan dan pengenceran contoh untuk metode MPN identik dengan prosedur untuk penghitungan koloni. Perbandingan volume medium harus dipertimbangkan. Pada dasarnya, 1 bagian dan 10 bagian medium harus digunakan. Jadi, apabila 10 g contoh digunakan, ini harus dilarutkan ke dalam 100 ml medium. Apabila mikroorganisma ada dalam cairan atau dalam contoh yang dilarutkan akan dihitung, konsentrasi dari medium dapat disesuaikan sehingga konsentrasi medium setelah ditambahkan contoh akan sesuai dengan medium berkekuatan tunggal. Apabila medium berkekuatan ganda digunakan, maka dapat ditambahkan contoh atau larutan pengenceran dalam jumlah yang setara.

Apabila menggunakan contoh yang tidak menimbulkan partikel-partikel seperti awan dalam medium, terbentuknya endapan setelah inkubasi dapat digunakan untuk mendeteksi pertumbuhan (tabung positif). Akan tetapi, dalam beberapa kasus contoh dapat terlihat dengan jelas sehingga endapan tidak dapat terlihat. Untuk ini, harus digunakan metode lain.

Gas yang diproduksi akibat aktivitas mikroorganisma dapat ditangkap dan diperiksa. Ini dapat dilakukan dengan alat penangkap gas atau tabung kecil yang diletakkan terbalik dalam medium sebelum dilakukan sterilisasi. Reaksi positif terjadi apabila terdapat gelembung-gelembung gas di dalam tabung terbalik tersebut.

5. PEMBACAAN DATA

Apabila metode tabung berganda digunakan, hasilnya dinyatakan sebagai "most probable number mikorganisma per gram". Tabel II dan III menunjukkan most probable number mikroorganisma yang setara dengan frekuensi tabung-tabung positif, yang diperoleh dengan tes 1 ml bagian dari pengenceran 1 : 10 (0,1 g bagian). Karena kemungkinan lebih dari 1 mikroorganisma bertanggung jawab terhadap hasil pengujian yang positif, penghitungan dari MPN mikroorganisma menggunakan fungsi logaritma.

Untuk mendapatkan nilai MPN, tentukan jumlah setiap tabung positif dari 3 pengenceran terpilih. Lihat tabel MPN dan catat hasilnya.

Tabel I.

Contoh dan pemecahan hasil yang diperoleh apabila lebih dari 3 porsi berbeda digunakan.

Contoh	0,1 g	0,01 g	0,001 g	0,0001 g
a)	5/5 *	5/5	2/5	0/5
b)	5/5	4/5	2/5	0/5 *
c)	0/5	1/5	0/5	0/5 *
d)	5/5	3/5	1/5	1/5
e)	5/5	3/5	2/5	0/5 *

* Apabila semua tabung memberikan nilai positif, pilih 3 volume terkecil yang diuji, dan tanda lebih besar (>) digunakan untuk menunjukkan bahwa nilai MPN lebih besar dari yang diberikan.

Apabila lebih dari 3 volume berbeda digunakan, gunakan hasil hanya 3 volume berturut-turut (tabel I).. Gunakan hasil dari volume terkecil yang mana memberikan hasil 5/5, dan hasil yang diperoleh pada 2 volume berikutnya. Hasil dari contoh ini adalah ekstrim; angka dengan tanda (*) tidak boleh digunakan dalam penghitungan. Contoh c di mana tidak ada 1 volume pun yang memberikan hasil 5/5, 3 volume terdepan harus digunakan untuk mendapatkan hasil positif pada volume tengah. Apabila hasil positif terjadi pada volume yang lebih kecil dari 3 volume yang dipilih sesuai dengan ketentuan (contoh d), tambahkan nilai yang lebih tinggi dari batas hasil ke nilai di atas batas yang berasal dari volume terkecil yang dipilih, sehingga memberikan hasil seperti pada contoh e.

Terkadang, dirasakan perlu untuk menghitung MPN dari volume terdahulu dari yang tercantum dalam tabel II dan III. Apabila porsi tertinggi yang digunakan untuk tabel acuan adalah 0,01 g dari pada 0,1 g, kalikan nilai MPN pada tabel dengan 10. Oleh sebab itu, hasil dari penentuan MPN dengan 5 tabung yang menunjukkan 3 tabung positif dengan porsi 0,01 g, 2 positif dengan porsi 0,001 g, dan 1 positif dengan porsi 0,0001 g (3 — 2 — 1) yang berdasarkan tabel II menunjukkan hasil 17, dan dikalikan dengan 10 untuk mendapatkan nilai 170 sebagai hasil MPN/g contoh. Begitu juga, apabila porsi tertinggi yang digunakan untuk tabel acuan adalah 10,0 g bukan 0,1 g, bagi nilai MPN dari tabel dengan 100. Oleh sebab itu, hasil dari penentuan MPN dengan 3 tabung untuk salmonella yang memberikan hasil 3 positif dari seluruh tabung dengan porsi 10 g 1 positif dengan porsi 1 g, dan tidak ada tabung positif dengan porsi 0,1 g (3 — 1 — 0),

yang berdasarkan tabel III menunjukkan hasil 43, dan dibagi dengan 100 untuk mendapatkan nilai 0,43 sebagai hasil MPN/g contoh.

Cara penghitungan lain untuk mendapatkan nilai MPN per gram makanan adalah dengan menggunakan rumus :

$$\frac{\text{MPN dari tabel}}{100} \times \text{faktor pengenceran dari tabung tengah} = \text{MPN/g.}$$

Semua pengamatan statistik tercantum dalam batas kepercayaan yang tercantum dalam 2 tabel tersebut. Interpretasi dari batasan-batasan tersebut adalah apabila seseorang mengatakan bahwa densitas sebenarnya dari organisma berkisar antara kedua batasan ini, maka ia akan berada pada 95% dari pernyataannya.

Penghitungan mikrobiologi harus dicatat sebagai "jumlah mikroorganisma per kuantitas contoh dengan metode MPN", contohnya, MPN coliform = 10/g. Dalam pelaporannya, perlu pula dijelaskan jumlah tabung yang digunakan untuk tiap pengenceran, misalnya 5 tabung MPN atau 3 tabung MPN dan metode yang digunakan.

Tabel II.

Most Probable Number (MPN) per 1 g contoh dan 95% tingkat kepercayaan.

Menggunakan lima tabung dengan porsi 0,1; 0,01 dan 0,001					
Jumlah Positif			MPN	Batas MPN	
0,1	Tabung 0,01	0,001	/g	Bawah	Atas
5	2	2	94	28	219
5	2	3	120	33	281
5	2	4	148	38	366
5	2	5	177	44	515
5	3	0	79	23	187
5	3	1	109	31	251
5	3	2	141	37	343
5	3	3	175	44	503
5	3	4	212	53	669
5	3	5	253	77	788
5	4	0	130	35	300
5	4	1	172	41	484
5	4	2	221	57	698
5	4	3	278	90	849
5	4	4	345	117	999
5	4	5	436	145	1.161
5	5	0	240	68	734
5	5	1	348	118	1.005
5	5	2	542	180	1.405
5	5	3	920	210	3.000
5	5	4	1.600	350	5.300
5	5	5	>1.600	800	—

Catatan : Jumlah tabung positif pada ke lima yang diuji.

Tabel III.

Most Probable Number (MPN) per 1 g contoh dan 95% tingkat kepercayaan.

Menggunakan tiga tabung dengan porsi 0,1; 0,01 dan 0,001					
Jumlah Positif			MPN	Batas MPN	
0,1	Tabung 0,01	0,001	/g	Bawah	Atas
0	0	0	< 3	—	—
0	0	1	3	0,5	9
0	1	0	3	< 0,5	13
1	0	0	4	< 0,5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	159
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1.300
3	3	1	460	71	2.400
3	3	2	1.100	150	4.800
3	3	3	> 2.400	—	—